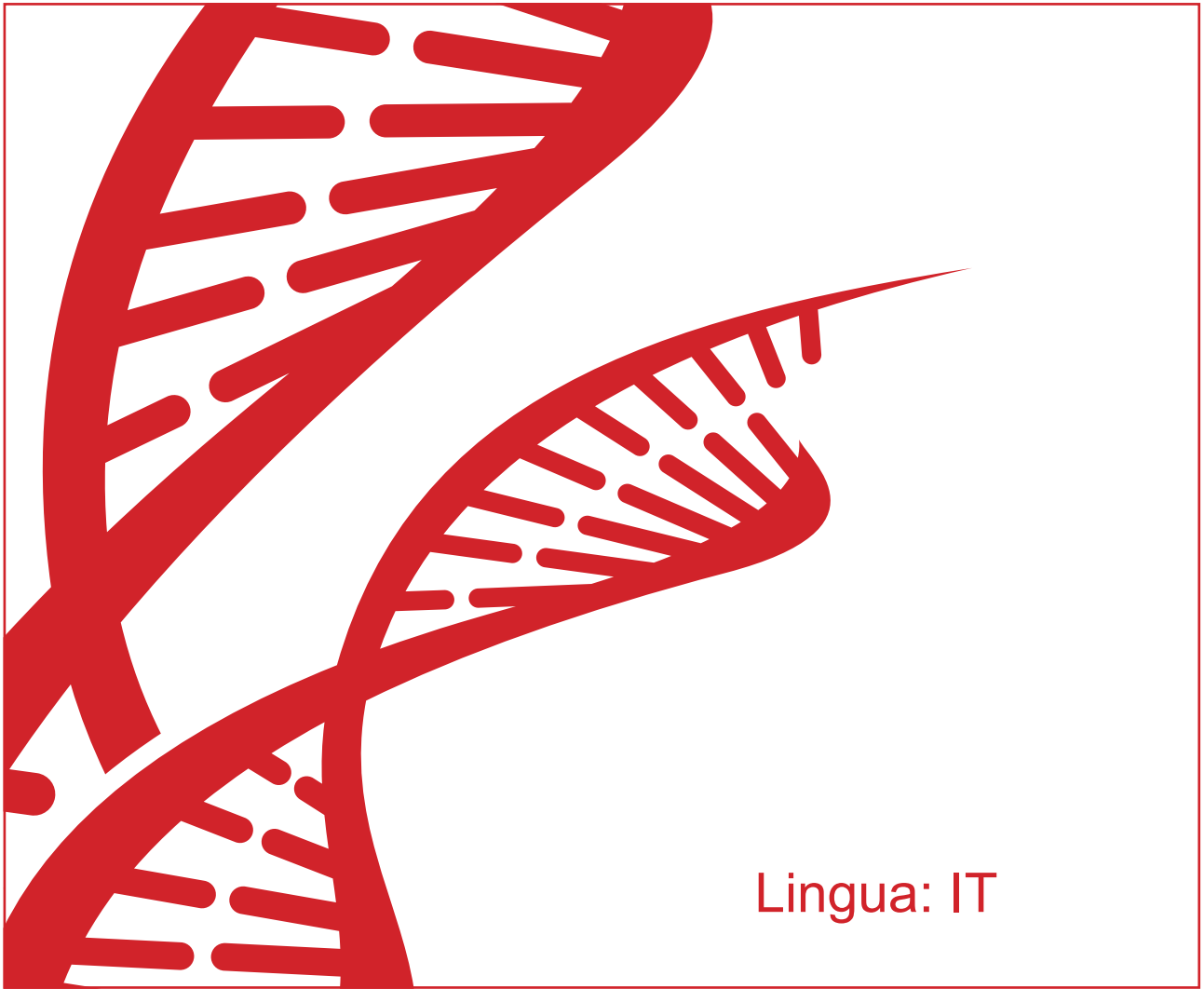


Istruzioni per l'uso

PSP® Spin Stool DNA Basic Kit



REF 1038120200
1038120300



50 preparazioni
250 preparazioni



Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
Germania

INVITEK
Molecular

Note importanti

Grazie per aver acquistato il **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** di Invitek Molecular.

Insieme allo **Stool DNA Stabilizer** (stabilizzatore del DNA di feci) o alle **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** (provette per la raccolta di feci con stabilizzatore di DNA), il prodotto consente di isolare manualmente il DNA da microrganismi e l'ospite dai campioni di feci utilizzando la tecnologia Spin Column.

AVVERTENZA! Un uso e una manipolazione impropri per scopi diversi da quelli previsti possono causare pericoli e danni. Pertanto, si invita a leggere e seguire attentamente le presenti istruzioni per l'uso. Tenerle sempre a portata di mano. Per evitare lesioni a persone, osservare anche le istruzioni di sicurezza.

Tutte le versioni delle istruzioni per l'uso sono scaricabili dal nostro sito web o possono essere richieste su: www.invitek-molecular.com

Contatto:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germania

+ 49 (0) 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Supporto tecnico:

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular, tutti i diritti riservati.

Il kit è conforme al REGOLAMENTO (UE) 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Tuttavia, non è pensato per l'uso diagnostico in vitro nei Paesi in cui il REGOLAMENTO (UE) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro non è riconosciuto.

Marchi commerciali: Invisorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. I marchi registrati, quelli commerciali, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non specificatamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non tutelati dalla legge.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® sono marchi commerciali registrati di Invitek Molecular GmbH.

Indice dei contenuti

1.	Istruzioni di sicurezza	3
2.	Informazioni sul prodotto	4
2.1	Il kit contiene	4
2.2	Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire	5
2.3	Conservazione, aspetto e scadenza.....	6
2.4	Uso previsto	6
2.5	Informazioni sul prodotto e specifiche	7
2.6	Principio e procedura	7
3.	Estrazione di acidi nucleici con il PSP [®] Spin DNA Di base Kit.....	8
3.1	Prima di avviare un protocollo	8
3.2	Campionamento e conservazione del materiale di partenza.....	9
3.3	Preparazione del materiale di partenza	9
3.4	Protocollo breve PSP [®] Spin Stool DNA Basic Kit	10
3.5	Protocollo 1: isolamento del DNA da campioni di feci fresche o congelate	11
3.6	Protocollo 2: Isolamento del DNA da campioni di feci stabilizzate	12
4.	Appendice	14
4.1	Risoluzione di problemi	14
4.2	Garanzia	15
4.3	Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura.....	15
4.4	Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive	16
4.5	Informazioni sull'ordine.....	16

1. Istruzioni di sicurezza

Accertarsi che chiunque utilizzi il presente prodotto abbia ricevuto le istruzioni sulle pratiche di sicurezza generali per i laboratori e le informazioni sulla sicurezza riportate nel presente documento.

- Nel maneggiare i prodotti chimici, indossare sempre indumenti protettivi, guanti monouso e occhiali di sicurezza.
- Cambiare sempre i puntali delle pipette tra un trasferimento di liquidi e l'altro. Per evitare la contaminazione incrociata, si consiglia l'uso di puntali per pipette con barriera antiaerosol.
- Non riutilizzare i materiali di consumo.
- Gettare i guanti qualora fossero esposti a contaminazioni.
- Non combinare componenti di kit diversi a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare una contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per minimizzare il rischio di infezioni dal materiale potenzialmente infettivo, raccomandiamo di lavorare in flusso d'aria laminare fino alla lisi dei campioni.

Prima di maneggiare i prodotti chimici, leggere e comprendere tutte le schede dati di sicurezza applicabili (MSDS). Queste sono reperibili su www.invitek-molecular.com.

Smaltire i residui del kit e i rifiuti liquidi in conformità alle normative nazionali, far riferimento alle MSDS. Invitek Molecular non ha testato i materiali infettivi residui nei rifiuti liquidi generati dal kit. La contaminazione di rifiuti liquidi con materiali infettivi residui è altamente improbabile ma non può essere esclusa del tutto. Pertanto, i rifiuti liquidi vanno considerati infettivi e devono essere manipolati e smaltiti in conformità alle normative di sicurezza locali.

Le frasi di rischio e sicurezza della Comunità Europea per i componenti del **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** a cui si applicano sono elencate di seguito come segue:

Stool DNA Stabilizer



Avvertenza

H319 –H412.-P280- P305-351-338-P273

Proteinase K



Pericolo

H315-319-334-335 P280-P305-P351-P338

Wash Buffer I



Avvertenza

H302-H412-P280-P305-P351-P338-P273-EUH032

H302: Nocivo se ingerito.

H315: Causa irritazioni cutanee.

H319: Provoca grave irritazione oculare.

H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

H335: Può irritare le vie respiratorie.

H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P273: Non disperdere nell'ambiente.

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

P305+P351+P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.

Informazioni mediche di emergenza possono essere ottenute 24 ore al giorno da infotrac, www.infotrac.net:

al di fuori degli USA: 1 – 352 – 323 – 3500

negli USA: 1 – 800 – 535 – 5053

2. Informazioni sul prodotto

2.1 Il kit contiene

Il **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** non include un buffer per la lisi del campione. Per la lisi del campione è necessario combinare il **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** con lo **Stool DNA Stabilizer** o gli **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** (cfr. capitolo 2.2 o 4.5 per informazioni sull'ordine). Lo **Stool DNA Stabilizer** ha la funzione di un buffer di lisi.

Lo **Stool DNA Stabilizer** (flacone da 180 ml) serve per l'isolamento diretto di campioni di feci fresche o congelate.

Gli **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** sono adatti alla gestione completa dei campioni e ne consentono la raccolta, il trasporto, la stabilizzazione e lo stoccaggio fino a tre mesi a temperatura ambiente.

	50 purificazioni	250 purificazioni
N. catalogo	1038120200	1038120300
InviAdsorb	50 provette	5 x 50 provette
Zirconia Beads II	2 fiale	8 fiale
Proteinase K	1 fiala per 1,5 ml di soluzione di lavoro	5 fiale per 5 x 1,5 ml di soluzione di lavoro
Binding Buffer A	9 ml/flacone (volume finale 30 ml)	36 ml/flacone (volume finale 120 ml)
Wash Buffer I	30 ml/flacone (volume finale 60 ml)	80 ml/flacone (volume finale 160 ml)
Wash Buffer II	18 ml/flacone (volume finale 60 ml)	2 x 45 ml/flacone (volume finale 2 x 150 ml)
Elution Buffer	15 ml/flacone	60 ml/flacone
2.0 ml Safe- Lock-Tubes	2 x 50 provette	2 x 250 provette
RTA Spin Filter Set	50 set	5 x 50 set
RTA Receiver Tubes	2 x 50 provette	10 x 50 provette
Receiver Tubes da 1,5 ml	2 x 50 provette	10 x 50 provette
Short Protocol	1 volantino	1 volantino

2.2 Reagenti e attrezzatura che l'utente deve fornire

Attrezzatura da laboratorio:

- microcentrifuga (*tutti i protocolli sono stati validati con una centrifuga 5415 D Eppendorf*)
- opzionale: centrifuga per 15 o 50 ml
- termoshaker (37 °C - 95 °C)
- cilindro di misurazione (250 ml)
- guanti monouso
- pipette e puntali per pipette
- miscelatore Vortex
- provette di reazione (1,5 ml, 2,0 ml)

Per la lisi del campione:

Prodotto	Dimensione della confezione	N. catalogo
Stool DNA Stabilizer ^{*)}	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	50 provette	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	250 provette	1038111300

***) Per 50 reazioni è sufficiente un flacone di Stool DNA Stabilizer, mentre per 250 reazioni ne occorrono due.**

Liquidi e solventi:

- 96 - 100 % etanolo (non denaturato)
- Isopropanolo*

*Il kit è validato con 2-propanolo; Rotipuran[®] >99,7%, p.a., ACS, ISO (n. ordine 6752) di Carl Roth

*** Possibili fornitori di isopropanolo:**

Carl Roth

2-Propanolo
Rotipuran[®] >99,7%, p.a., ACS, ISO
N. ordine 6752

Applichem

2-Propanolo per la biologia molecolare
N. ordine A3928

Sigma

2-Propanolo
N. ordine 59304-1L-F

2.3 Conservazione, aspetto e scadenza

Data di scadenza: tutti i tamponi e i kit di componenti possono essere conservati a temperatura ambiente e presentano una scadenza, come riportato sull'etichetta della confezione del kit esterno.

Dopo l'apertura, i componenti individuali del kit, come quelli preparati in modo conforme prima del primo uso, hanno una scadenza di 3 mesi.

Prima di ogni uso, accertarsi che tutti i componenti siano a temperatura ambiente. Se nelle soluzioni sono presenti precipitati per via della temperatura, scioglierli riscaldandoli accuratamente (fino a 30 °C).

La temperatura ambiente è definita come intervallo di 15-30 °C.

Wash Buffer R1 e Wash Buffer II: dopo aver aggiunto l'etanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

Binding Buffer A: dopo aver aggiunto l'isopropanolo, chiudere per bene e conservare a temperatura ambiente.

Proteinase K: una volta disciolto in DNase/RNase free water, il Proteinase K può essere conservato a 2 - 8 °C per massimo due mesi. Per una conservazione più lunga, conservare a -20 °C, congelare e scongelare una sola volta.

Stool DNA Stabilizer/Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer (da ordinare a parte): in presenza di precipitati relativi alla temperatura nello stabilizzatore del DNA, scioglierli riscaldandoli accuratamente a 30 °C in un bagno ad acqua, agitandoli di tanto in tanto durante il processo di scioglimento.

2.4 Uso previsto

Il **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** è un kit di estrazione dell'acido nucleico basato sulla tecnologia Spin Column, destinato all'isolamento e alla purificazione simultanea del DNA batterico e del DNA ospite di campioni di feci umane.

Il **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** è pensato per essere utilizzato con campioni di feci umane fresche, congelate o stabilizzate. Per i campioni di feci fresche o congelate, il prodotto va combinato con lo **Stool DNA Stabilizer**. Per una gestione completa del campione (campionamento, trasporto) e la stabilizzazione a temperatura ambiente, il prodotto va combinato con gli **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer**. L'aggiunta dello **Stool DNA Stabilizer** al **PSP® Spin Stool DNA Basic Kit** è essenziale per la lisi del campione. **Stool DNA Stabilizer** e **Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer** vanno acquistati separatamente.

Esso è previsto per l'uso esclusivo da parte di professionisti, come tecnici di laboratorio, medici e biologi con formazione in tecniche di biologia molecolare e procedure diagnostiche *in vitro*.

2.5 Informazioni sul prodotto e specifiche

Materiale di partenza	Resa	Qualità	Tempo
Campioni di feci fresche o congelate: max. 200 mg	fino a 50 µg, a seconda del campione (archiviazione e fonte)	$A_{260} : A_{280}$ 1,4 – 1,8	Circa 45 min (incl. lisi)
Campioni di feci stabilizzate (Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer): 1,4 ml			

La resa e la qualità di DNA purificato dalle feci dipendono dal contenuto batterico, dalla fonte del campione, da trasporto, stoccaggio e età. Le condizioni di salute del donatore possono influenzare resa e qualità, soprattutto in caso di determinate malattie e determinati farmaci, riducendo la qualità degli acidi nucleici purificati.

Applicazioni a valle:

La resa e la qualità degli acidi nucleici isolati sono generalmente adatte a numerose applicazioni diagnostiche molecolari, come tecniche PCR, analisi del microbioma (NGS) e metodi di ibridazione. Le applicazioni a valle devono essere eseguite secondo le specifiche dei rispettivi produttori.

2.6 Principio e procedura

1. Campioni di lisi

I campioni di feci vengono lisati nello Stool DNA Stabilizer in condizioni di denaturazione e diversi livelli di temperatura specifici per l'acido nucleico target. Le cellule umane per isolare il DNA ospite vengono lisate a temperatura ambiente, mentre quelle batteriche devono essere incubate a temperature più elevate. Per la lisi delle cellule batteriche, vengono aggiunte Zirconia beads (sfere di Zirconia) per accrescere l'efficienza della lisi.

2. Rimozione degli inibitori di PCR e digestione delle proteine

Dopo la lisi, le sostanze che degradano il DNA e gli inibitori di PCR presenti nelle feci vengono adsorbiti nella matrice di InviAdsorb. InviAdsorb è in provette Safe-Lock preriempite, nelle quali deve essere inserito il lisato. I contaminanti legati e i detriti cellulari vengono pellettizzati mediante centrifugazione. Il supernatante contiene il DNA pre-purificato.

La proteinasi K viene aggiunta al supernatante per digerire e degradare le proteine a temperatura elevata.

3. Legare gli acidi nucleici

Aggiungendo il Binding Buffer A al lisato, vengono regolate condizioni di legame ottimali. Ogni lisato è poi applicato ad un RTA Spin Filter e gli acidi nucleici vengono adsorbiti alla membrana.

4. Lavare per rimuovere le contaminazioni residue

I contaminanti vengono eliminati in modo efficiente utilizzando Wash Buffer I e Wash Buffer II, mentre gli acidi nucleici rimangono legati alla membrana.

5. Eluire il DNA

Gli acidi nucleici sono eluiti dall'RTA Spin Filter utilizzando 100 - 200 µl di Elution Buffer.

3. Estrazione di acidi nucleici con il PSP® Spin DNA Di base Kit

3.1 Prima di avviare un protocollo

Quando si utilizza il kit per la prima volta, accertarsi che tutti i tamponi e i reagenti siano preparati come indicato:

Preparazioni di tampone prima del primo utilizzo: 50 preparazioni
Binding Buffer A: riempire il flacone con 21 ml di isopropanolo al 99,7% (grado per biologia molecolare) e miscelare agitando energicamente per 1 minuto. Mescolare capovolgendo più volte appena prima dell'uso. Tenere sempre il flacone ben chiuso.
Proteinase K: risospendere il Proteinase K liofilizzato aggiungendo 1,5 ml di DNase/RNase free water alla fiala e mescolare accuratamente fino al completo scioglimento.
Wash Buffer I: aggiungere 30 ml di etanolo al 96 -100% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
Wash Buffer II: aggiungere 42 ml di etanolo al 96 -100% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
Preparazioni di tampone prima del primo utilizzo: 250 preparazioni
Binding Buffer A: riempire il flacone con 84 ml di isopropanolo al 99,7% (grado per biologia molecolare) e miscelare agitando energicamente per 1 minuto. Mescolare capovolgendo più volte appena prima dell'uso. Tenere sempre il flacone ben chiuso.
Proteinase K: risospendere il Proteinase K liofilizzato aggiungendo 1,5 ml di DNase/RNase free water ad ogni fiala e mescolare accuratamente fino al completo scioglimento.
Wash Buffer I: aggiungere 80 ml di etanolo al 96 -100% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.
Wash Buffer II: aggiungere 105 ml di etanolo al 96 -100% al flacone. Miscelare per bene, tenendo il flacone sempre ben chiuso.

- Regolare il termoshaker a 70°C.
- Regolare il termoshaker/i blocchi di riscaldamento a 70°C e 95 °C
- Riscaldare la quantità necessaria di **Elution Buffer** a 70°C (occorrono 100 - 200 µl di **Elution Buffer** per campione).
- Determinare il numero di reazioni necessarie inclusi i controlli ed etichettare la quantità necessaria di RTA Spin Filter (coperchio) e di Receiver Tube da 1,5 ml (per campione: 1 Receiver Tube necessario).

3.2 Campionamento e conservazione del materiale di partenza

Per rese riproducibili ed elevate, è essenziale una corretta conservazione del campione. Le rese possono variare a seconda di fattori come stato nutrizionale del donatore, età del campione, tipo di campione, trasporto e stoccaggio.

Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo dei campioni per evitare una degradazione dell'acido nucleico. In linea generale, sono i campioni freschi a dare i migliori risultati. Si raccomanda di tener conto di guide tecniche, come standard CEN/TS e ISO, in materia di processo di pre-esame per la diagnostica molecolare in IVDR, come evidenziato in G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Campioni di feci fresche: i campioni contengono DNasi, che possono causare rapidamente la degradazione di DNA. I campioni di feci fresche possono essere conservati per 1-2 ore a temperatura ambiente; lo Stool DNA Stabilizer va aggiunto al campione il prima possibile. In caso contrario, i campioni vanno congelati a -80°C .

Campioni di feci stabilizzate: i campioni di feci possono essere stabilizzati utilizzando gli Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer di Invitek Molecular (far riferimento alle informazioni sull'ordine), che consentono campionamento, stoccaggio e trasporto del campione. Per il campionamento viene raccolto 1 g di feci con il cucchiaino integrato nel coperchio della provetta di raccolta. Questa va poi ben chiusa. Il campione va miscelato agitando a fondo o su vortex per omogeneizzare il campione con lo Stool DNA Stabilizer nella provetta. I campioni possono essere conservati negli Stool Collection Tubes with DNA Stabilizer per massimo tre mesi a temperatura ambiente. Un tempo di conservazione inferiore a 3 mesi non influisce sulla qualità o sulla quantità di DNA. Nel lungo termine, i campioni possono essere congelati a -20°C o -80°C . Si raccomanda di aliquotare i campioni prima del congelamento.

3.3 Preparazione del materiale di partenza

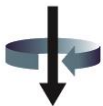
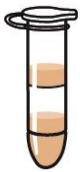
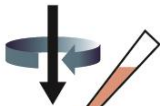
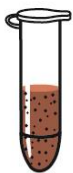
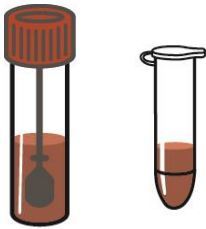
Campioni di feci fresche, liquidi: se il campione è liquido, pipettare 200 μl in una provetta Safe-Lock da 2,0 ml. Tagliare l'estremità del puntale della pipetta per facilitare il pipettaggio. Procedere aggiungendo lo Stool DNA Stabilizer come descritto nel protocollo di estrazione.

Campioni di feci congelate: utilizzare un bisturi o una spatola per raschiare frammenti di feci in una provetta Safe-Lock da 2,0 ml sul ghiaccio. Accertarsi che i campioni non si scongelino finché non viene aggiunto lo Stool DNA Stabilizer, altrimenti il DNA nel campione potrebbe degradarsi.

I campioni nello Stool Stabilizer possono essere scongelati direttamente riscaldandoli accuratamente, evitare più cicli di congelamento e disgelo, che possono portare alla rottura del DNA, aliquotando i rispettivi campioni.

3.4 Protocollo breve PSP® Spin Stool DNA Basic Kit

Campioni di lisi



1. **Campioni di feci fresche/congelate:** pesare 200 mg di campione di feci (fresche o congelate) in una provetta Safe-Lock da 2,0 ml, aggiungere 1,2 ml di Stool DNA Stabilizer, agitare energicamente su vortex per 1 min. **Campioni stabilizzati:** trasferire 1,4 ml di campione dallo Stool Collection Tube with DNA Stabilizer dopo la conservazione o subito dopo il campionamento in una provetta Safe-Lock da 2,0 ml.

a) **Isolamento del DNA ospite**

Incubare per 10 min a temperatura ambiente, agitando continuamente a 900 giri/min

Centrifugare per 1 min a 11.000 x g

b) **Isolamento del DNA batterico**

Incubare per 10 min a 95 °C, agitando continuamente a 900 giri/min.

Aggiungere 5 **Zirconia Beads II** per omogeneizzare e agitare su vortex per 2 minuti

Centrifugare per 1 min a 11.000 x g

c) **Isolamento del DNA da batteri difficili da lisare**

Incubare per 10 min a 95 °C, agitando continuamente a 900 giri/min.

Incubare 3 min su ghiaccio

Aggiungere 5 **Zirconia Beads II** e incubare 3 min a 95 °C. Agitare su vortex per 2 min, centrifugare per 1 min a 11.000 x g

Rimozione degli inibitori di PCR e digestione delle proteine

2. Trasferire il supernatante in un **InviAdsorb-Tube**, agitare energicamente su vortex per 15 sec

Incubare per 1 min a temperatura ambiente. Centrifugare per 3 min a velocità massima.

3. Trasferire completamente il supernatante in un nuovo Receiver Tube da 1,5 ml, eliminare il pellet con InviAdsorb. Centrifugare per 3 min a velocità massima.

4. Trasferire 25 µl di **Proteinase K** in una nuova provetta Safe-Lock da 2,0 ml, una pipetta da 400 µl o **800 µl per campioni stabilizzati** di supernatante dal passaggio 3 alla provetta Safe-Lock contenente **Proteinase K**, miscelare brevemente agitando su vortex. Incubare per 10 min a 70°C, agitando continuamente a 900 giri/min.

Legare il DNA genomico

5. Aggiungere 200 µl di **Binding Buffer A** o **400 µl di Binding Buffer A per campioni stabilizzati** al lisato, miscelare a breve agitando su vortex o pipettando più volte su e giù

Prendere un set di RTA Spin Filter. Trasferire completamente la miscela (**in due passaggi per campioni stabilizzati**) all'RTA Spin Filter.

Chiudere l'RTA Spin Filter e incubare per 1 min a temperatura ambiente.

Centrifugare per 2 min a 11.000 x g. Eliminare il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube da 2.0 ml.

Lavare per rimuovere le contaminazioni residue

6. Aggiungere 500 µl di **Wash Buffer I** e centrifugare per 1 min a 11.000 x g.

Eliminare il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube da 2.0 ml

7. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer II**, centrifugare per 1 min a 11.000 x g

Eliminare il filtrato e **riposizionare** l'RTA Spin Filter nell'RTA Receiver da 2,0 ml

8. Centrifugare per 4 min a velocità massima per rimuovere completamente l'etanolo
Eliminare l'RTA Receiver Tube

Eluire il DNA

9. Posizionare l'RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml. Aggiungere 100-200 µl di **Elution Buffer** preriscaldato (70 °C)

Incubare per 1 min a temperatura ambiente

Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per eluire il DNA. Eliminare l'RTA Spin Filter

3.5 Protocollo 1: isolamento del DNA da campioni di feci fresche o congelate

1. Pesare 200 mg di campione di feci (fresche o congelate) in una provetta Safe-Lock da 2,0 ml, aggiungere 1,2 ml di **Stool DNA Stabilizer** ad ogni campione. Agitare su vortex per 1 min. Anche per volumi di campione inferiori, utilizzare la medesima quantità di **Stool DNA Stabilizer**.
 - a) **Isolamento del DNA ospite**
Incubare per 10 min a temperatura ambiente, agitando continuamente a 900 giri/min.
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per pellet di particelle di feci solide.
 - b) **Isolamento del DNA batterico**
Incubare per 10 min a 95 °C, agitando continuamente a 900 giri/min.
Aggiungere 5 **Zirconia Beads II** per omogeneizzare e agitare su vortex per 2 minuti
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per pellet di particelle di feci solide e beads.
 - c) **Isolamento del DNA da batteri difficili da lisare**
Incubare per 10 min a 95 °C, agitando continuamente a 900 giri/min.
Incubare 3 min su ghiaccio.
Aggiungere 5 **Zirconia Beads II** per omogeneizzare e incubare per 3 minuti a 95 °C.
Agitare il campione su vortex per 2 min, centrifugare per 1 min a 11.000 x g per pellet di particelle di feci solide e beads.
2. Trasferire il supernatante in un **InviAdsorb-Tube** e agitare energeticamente su vortex per 15 sec
Incubare per 1 min a temperatura ambiente.
Centrifugare per 3 min a velocità massima.
3. Trasferire completamente il supernatante in un nuovo Receiver Tube da 1,5 ml, eliminare il pellet con InviAdsorb.
Centrifugare per 3 min a velocità massima.
4. Trasferire 25 µl di **Proteinase K** in una nuova provetta Safe-Lock da 2,0 ml, una pipetta da 400 µl di supernatante dal passaggio 3 alla provetta Safe-Lock contenente **Proteinase K**, miscelare brevemente agitando su vortex.
Incubare per 10 min a 70°C, agitando continuamente a 900 giri/min.
5. Aggiungere 200 µl di **Binding Buffer A** al lisato e miscelare a breve agitando su vortex o pipettando più volte su e giù.
Prendere un set di RTA Spin Filter. Trasferire la miscela interamente nell'RTA Spin Filter.
Chiudere l'RTA Spin Filter e incubare per 1 min a temperatura ambiente.
Centrifugare per 2 min a 11.000 x g
Eliminare il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube da 2,0 ml.
6. Aggiungere 500 µl di **Wash Buffer I**, centrifugare per 1 min a 11.000 x g.
Eliminare il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube da 2,0 ml.
7. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer II** e centrifugare per 1 min a 11.000 x g.
Eliminare il filtrato e **riposizionare** l'RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube da 2,0 ml.
8. Centrifugare per 4 min a velocità massima per rimuovere completamente l'etanolo.
Eliminare l'RTA Receiver Tube.

9. Posizionare l'RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml. Aggiungere 100-200 µl di **Elution Buffer** preriscaldato (70 °C).
Incubare per 1 min a temperatura ambiente.
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per eluire il DNA. Eliminare l'RTA Spin Filter.

Nota: *Il DNA può essere eluito anche in un volume inferiore di Elution Buffer (in base alla resa attesa). Il volume di eluizione minimo è di 50 µl; si osservi che l'uso di un volume di eluizione basso può ridurre la resa massima. Se ci si aspetta un'ampia quantità di DNA, il volume di eluizione può essere aumentato.*

Nota: *Per uno stoccaggio di medio termine, si raccomanda di conservare il DNA eluito a – 20°C.*

3.6 Protocollo 2: Isolamento del DNA da campioni di feci stabilizzate

1. Raccogliere il campione con lo **Stool Collection Tube with DNA Stabilizer**.
Trasferire 1,4 ml di campione di feci ben omogeneizzato dalla provetta di raccolta dopo la conservazione o subito dopo il campionamento in una provetta Safe-Lock da 2,0 ml.
 - a) **Isolamento del DNA ospite**
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per pellet di particelle di feci solide.
 - b) **Isolamento del DNA batterico**
Incubare per 10 min a 95 °C, agitando continuamente a 900 giri/min.
Aggiungere 5 **Zirconia Beads II** per omogeneizzare e agitare su vortex per 2 minuti
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per pellet di particelle di feci solide e beads.
 - c) **Isolamento del DNA da batteri difficili da lisare**
Incubare per 10 min a 95 °C, agitando continuamente a 900 giri/min.
Incubare 3 min su ghiaccio.
Aggiungere 5 **Zirconia Beads II** all'omogeneizzato
Incubare 3 min a 95°C.
Agitare il campione su vortex per 2 min, centrifugare per 1 min a 11.000 x g per pellet di particelle di feci solide e beads.
2. Trasferire il supernatante in un **InviAdsorb-Tube** e agitare energeticamente su vortex per 15 sec
Incubare per 1 min a temperatura ambiente.
Centrifugare per 3 min a velocità massima.
3. Trasferire completamente il supernatante in un nuovo Receiver Tube da 1,5 ml, eliminare il pellet con InviAdsorb.
Centrifugare per 3 min a velocità massima.
4. Trasferire 25 µl di **Proteinase K** in una nuova provetta Safe-Lock da 2,0 ml, una pipetta da 800 µl di supernatante dal passaggio 3 alla provetta Safe-Lock contenente **Proteinase K**, miscelare brevemente agitando su vortex.
Incubare per 10 min a 70°C, agitando continuamente a 900 giri/min.

5. Aggiungere 400 µl di **Binding Buffer A** al lisato e miscelare a breve agitando su vortex o pipettando più volte su e giù.
Prendere un set di RTA Spin Filter. Trasferire la miscela interamente, **in due passaggi**, nell'RTA Spin Filter.
Chiudere l'RTA Spin Filter e incubare per 1 min a temperatura ambiente.
Centrifugare per 2 min a 11.000 x g
Eliminare il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube da 2,0 ml.
6. Aggiungere 500 µl di **Wash Buffer I**, centrifugare per 1 min a 11.000 x g.
Eliminare il filtrato e posizionare l'RTA Spin Filter in un nuovo RTA Receiver Tube da 2,0 ml.
7. Aggiungere 700 µl di **Wash Buffer II** e centrifugare per 1 min a 11.000 x g.
Eliminare il filtrato e **riposizionare** l'RTA Spin Filter nell'RTA Receiver Tube da 2,0 ml.
8. Centrifugare per 4 min a velocità massima per rimuovere completamente l'etanolo.
Eliminare l'RTA Receiver Tube.
9. Posizionare l'RTA Spin Filter in un Receiver Tube da 1,5 ml. Aggiungere 100-200 µl di **Elution Buffer** preriscaldato (70 °C).
Incubare per 1 min a temperatura ambiente.
Centrifugare per 1 min a 11.000 x g per eluire il DNA. Eliminare l'RTA Spin Filter.

Nota: *Il DNA può essere eluito anche in un volume inferiore di Elution Buffer (in base alla resa attesa). Il volume di eluizione minimo è di 50 µl; si osservi che l'uso di un volume di eluizione basso può ridurre la resa massima. Se ci si aspetta un'ampia quantità di DNA, il volume di eluizione può essere aumentato.*

Nota: *Per uno stoccaggio di medio termine, si raccomanda di conservare il DNA eluito a –20°C.*

4. Appendice

4.1 Risoluzione di problemi

Problema	Causa possibile	Raccomandazione
RTA Spin Filter intasato	Lisi cellulare insufficiente e/o troppo materiale di partenza	Aumentare il tempo di lisi Aumento della velocità di centrifuga Ridurre la quantità di materiale di partenza
Contaminazione e RNA	L'RTA Spin Filter può purificare quantità basse di DNA	Aggiungere 20 µl di RNase A (10 mg/ml) e incubare per 10 minuti prima di aggiungere il Binding Buffer A.
Quantità ridotta degli acidi nucleici	Lisi cellulare insufficiente	Aumentare il tempo di lisi Ridurre la quantità di materiale di partenza per evitare un sovraccarico della colonna Prolungare il tempo di incubazione a 95 °C, utilizzare Zirconia Beads
	Eluizione incompleta	Aumentare il tempo di incubazione con Elution Buffer preriscaldato a 5 min Eluire due volte con 100 µl di Elution Buffer Impiegare un volume maggiore di Elution Buffer
	Bassa concentrazione di acido nucleico nel campione	Eluire il DNA con un volume inferiore di Elution Buffer , non impiegare volumi inferiori a 50 µl
	Conservazione errata del materiale di partenza	Assicurarsi che il materiale di partenza sia conservato in modo consono. Evitare ripetuti cicli di scongelamento del materiale campione.
	I tamponi sono stati preparati in modo errato	Accertarsi che la quantità corretta di etanolo/isopropanolo sia aggiunta ai tamponi e che tutte le soluzioni siano conservate ben chiuse.
	Omogenizzazione insufficiente del campione e Stool DNA Stabilizer	Ripetere la procedura di purificazione del DNA con un nuovo campione. Accertarsi di miscelare il campione nello Stool DNA Stabilizer finché il campione non sia completamente omogeneizzato. Utilizzare Zirconia Beads II e agitare su vortex per l'omogenizzazione.
	Miscelare in modo insufficiente il campione con il Binding Buffer A	Miscelare il campione accuratamente pipettando prima di trasferirlo alla membrana dell'RTA Spin Filter.
Acidi nucleici degradati/ low A₂₆₀/A₂₈₀ ratio	Eliminazione inefficiente di sostanze inibitorie dovuta ad una miscelazione insufficiente con la matrice InviAdsorb	Ripetere la procedura di purificazione del DNA con un nuovo campione, accertarsi di miscelare il campione e la matrice InviAdsorb finché il campione non sia completamente omogeneizzato.
	Diminuzione dell'attività della proteinasi	Ripetere la procedura di purificazione del DNA con un nuovo campione e con la Proteinase K. Per i casi difficili, utilizzare un volume doppio di Proteinase K.
	Wash Buffer I e Wash Buffer II utilizzati nell'ordine sbagliato	Accertarsi che Wash Buffer I e Wash Buffer II siano utilizzati nell'ordine corretto nel protocollo.

Gli acidi nucleici non funzionano bene nelle applicazioni a valle (ad es. PCR in tempo reale o NGS)	Troppo DNA utilizzato nella reazione a valle	Il DNA estratto può provenire da molti organismi differenti presenti nel campione di feci originale (es. umano, animali, vegetali, batterico). Ridurre l'importo di eluato o diluire il campione utilizzato nella reazione a valle.
	Lisi cellulare insufficiente	Vedi sopra

4.2 Garanzia

Invitek Molecular garantisce il perfetto funzionamento del kit per le applicazioni descritte nel presente manuale e in conformità all'uso previsto. In conformità al sistema di gestione della qualità a norma EN ISO 13485 di Invitek Molecular, la prestazione di tutti i componenti del kit è stata testata per assicurare la qualità del prodotto.

Qualsiasi problema, incidente o difetto sarà riportato a Invitek Molecular subito dopo il rilevamento. Ispezionare il prodotto al ricevimento dello stesso per garantirne la completezza e l'integrità. In presenza di discrepanze, informare subito Invitek Molecular per iscritto. La garanzia non copre eventuali modifiche al kit e ai protocolli né un uso diverso da quello previsto.

Invitek Molecular si riserva il diritto di modificare, alterare o cambiare qualsiasi prodotto per migliorarne la prestazione e il design in qualsiasi momento.

Invitek Molecular garantisce i prodotti come stabilito nelle Condizioni Generali disponibili all'indirizzo www.invitek-molecular.com. Per eventuali domande contattare techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Simboli utilizzati su prodotto e etichettatura



Produttore



Numero di lotto



Identificatore univoco del dispositivo medico



Numero di catalogo



Data di scadenza



Consultare le istruzioni per l'uso



Limitazione della temperatura



Non riutilizzare



Quantità di preparati per campioni



dispositivo medico diagnostico in vitro

4.4 Ulteriori documenti e informazioni aggiuntive

Visitare www.invitek-molecular.com per ulteriori informazioni su:

- FAQ e suggerimenti per la risoluzione di problemi
- Manuali in varie lingue
- Schede dati di sicurezza (MSDS)
- Supporto web
- Video prodotti

Se, nonostante un attento studio delle istruzioni per l'uso e ulteriori informazioni, si avesse ancora bisogno di assistenza, scrivere all'indirizzo techsupport@invitek-molecular.com o contattare il proprio rivenditore.

4.5 Informazioni sull'ordine

Prodotto	Dimensione della	N. catalogo
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	50 preparazioni	1038120200
PSP® Spin Stool DNA Basic Kit	250 preparazioni	1038120300

Per la lisi del campione:

Prodotto	Dimensione della confezione	N. catalogo
Stool DNA Stabilizer*)	180 ml	1038111100
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	50 provette	1038111200
Stool Collection Tube with DNA Stabilizer	250 provette	1038111300

***) Per 50 reazioni è sufficiente un flacone di Stool DNA Stabilizer, mentre per 250 reazioni ne occorrono due.**

Cronologia delle revisioni

Revisione	Data	Descrizione
IT-v1-2022	2022-06-15	Nuovo documento

INVITEK Molecular

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Germania

Telefono: +49 30 9489 2908
Fax: +49 30 9489 3795
info@invitek-molecular.com

www.invitek-molecular.com



<https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html>

2022-06-15 IT-v1-2022